Aus der chirurgischen Klinik der Universität Bern

Direktor: Professor Dr. K. Lenggenhager

DAS UNSPEZIFISCHE VERHALTEN DER THROMBOCYTEN BEI DER BLUTGERINNUNGSEINLEITUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von

Jürg Binswanger

von Kreuzlingen

ARNAUD DRUCK BERN 1956

Aus der chirurgischen Klinik der Universität Bern

Direktor: Professor Dr. K. Lenggenhager

DAS UNSPEZIFISCHE VERHALTEN DER THROMBOCYTEN BEI DER BLUTGERINNUNGSEINLEITUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Universität Bern

vorgelegt von

Jürg Binswanger

von Kreuzlingen

ARNAUD DRUCK BERN 1956

Von der Medizinischen Fakultät auf Antrag des Herrn Prof. Dr. K. Lenggenhager zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 13. Juli 1955

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. B. Walthard

I. EINLEITUNG

1. KURZER UEBERBLICK UEBER DIE BLUTGERINNUNG

Das plasmatische Prothrombokinin nach Lenggenhager [1] geht unter Einwirkung des Thrombokatalysins nach Lenggenhager (vergl. Factor V nach Owren [5]) und in Gegenwart einer Fremdkörperoberfläche und Ca-Jonen in Thrombokinin (= Thrombokinase) über. Dieses verbindet sich mit Prothrombin und wird zu Thrombin, welches eine entsprechende Menge Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Das Thrombin seinerseits bewirkt aber auch, gleichsam in rückläufiger Weise, eine Entstabilisierung des bisher noch nicht in Reaktion getretenen plasmatischen, aber an Blutzellen gebundenen Prothrombokinins. Damit entfaltet sich der gesamte Gerinnungsvorgang plötzlich lawinenartig ("Thrombinlawine"), und aus diesem Grunde setzt die massive und totale Blutgerinnung ein.

2. DIE EIGENSCHAFTEN VON PROTHROMBOKININ UND THROMBOKININ

Das Prothrombokinin, ein in der Leber gebildeter Eiweisskörper, wird durch Thrombokatalysin zum hitzelabilen plasmatischen Thrombokinin aktiviert.

Ein hitzestabiles Organthrombokinin entsteht aus akut geschädigtem Gewebe. Es verkürzt die Gerinnungszeit im Normalblut und wirkt in frischem Citratblut zusammen mit Ca-Jonen gerinnungsbeschleunigend und thrombinvermehrend.

Ein Hauptteil des Plasmatischen Thrombokinins ist nach Lenggenhager wohl an die corpusculären Elemente des Blutes adsorbiert.

3. ENTHALTEN ALLE BLUTZELLEN THROMBOKININARTIGE STOFFE, ODER SIND DIE THROMBOCYTEN ALLEIN DAFUER VERANTWORTLICH ?

Fonio schreibt in einer kürzlich erschienenen Arbeit [4] folgendes: "Den Thrombocyten kommt beim Gerinnungsvorgang eine doppelte Funktion zu: Abgabe bezw. Sekretion eines Gerinnungsfaktors an das Plasma, wahrscheinlich des Thromboplastins oder eines präkursorischen Faktors in der ersten Phase und eines Retraktozyms in der dritten Phase". Um dies zu beweisen, fraktionierte er durch wiederholte Zentrifugierung den Inhalt der Thrombocyten, nachdem er sie durch Ultra-Beschallung zertrümmert hatte, in ein Granulomer und ein Hyalomer. Währenddem der gerinnungsbeschleunigende Faktor - der durch Fonio als Thromboplastin angesprochen wird - einzig an die Granula gebunden ist, scheint das Hyalomer dann für eine ganz andere Phase der Gerinnung, nämlich die der Retraktion, von Bedeutung zu sein. Somit wäre nach Fonio das Granulomer der Thrombocyten für

die Gerinnungseinleitung allein ursächlich, und zwar würde es in Aktion treten, sobald die Thrombocyten an einer traumatisch oder durch entzündliche oder ödematöse Vorgänge geschädigten Stelle im Blutgefässsystem unter Agglutinatbildung adhaerieren.

Im Lichte der im Abschnitt 1 unserer Einleitung dargelegten Gerinnungsvorgänge ergibt sich insofern eine Uebereinstimmung, als das Thromboplastin (Fonio) dem Thrombokinin (Lenggenhager) entspricht, und dass der "praekursorische Faktor" wohl dem Prothrombokinin gleichzustellen ist.

Worin jedoch die Ansichten auseinandergehen, ist die Tatsache, dass Fonio die gerinnungseinleitenden Stoffe als allein aus den Thrombocyten entspringend betrachtet, währenddem Lenggenhager immer wieder nachdrücklich darauf hinweist, dass die genannten Stoffe - wahrscheinlich z.T. adsorptiv - an alle Blutzellen gebunden sind. Am stärksten gerinnungsaktiv erwiesen sich Erythrocyten [2].

II. DIE HERSTELLUNG EINER REINEN ERYTHROCYTENSUSPENSION

Wir bedienen uns hier eines Verfahrens, bei dem wir, sofort nach Blutentnahme, systematisch die Thrombocyten und schliesslich die Leucocyten von den Erythrocyten abtrennen.

Das durch Venenpunktion gewonnene Blut wird sogleich defibriniert. Damit verfangen sich die Thrombocyten sozusagen ausnahmslos in dem um den rotierenden Glasstab herum sich bildenden Blutcoagulum. Die zur Sicherheit ausgeführte Thrombocytenzählung bestätigt, dass das ungerinnbar gemachte Blut höchstens in Spuren oder überhaupt keine Plättchen mehr enthält.

Die Abtrennung der Leucocyten erfordert nun eine wiederholte, kurz dauernde Zentrifugierung. (Eine Adsorptionsmethode, bei der man das Blut durch ganz feines, angehäuftes Glashaar fliessen liess, und ein Versuch, eine Trennung vermittelst spontaner Sedimentation in langen Glasröhren von unterschiedlichem Querschnitt zu erzielen, schlugen fehl.) Wir fanden nämlich, dass nach kurz dauernder Zentrifugierung (60" bei 3000 Touren) am Grunde des Zentrifugengläschens ein zuerst Erythrocyten-reiches Milieu vorherrscht. Dies war die grundlegende Feststellung, die uns schliesslich zu folgender einfacher Methode für die Darstellung reiner Erythrocyten brachte:

Entnahme von ca. 40 ccm Blut (Venenpunktion). Anschliessend wird sofort defibriniert (man rührt das Blut mit einem Glasstäbchen, das man häufig um seine

eigene Achse dreht). Nach etwa 3' beginnen die sich bildenden Fibrinfäden langsam mantelförmig um den Glasstab herum sich zu verfangen. Dabei reissen sie die Thrombocyten an sich. Nach 5' ist vollständige Defibrinierung erreicht. Damit ja keine Fibrinreste zurückbleiben, rühren wir noch 3' weiter. Darauf wird das defibrinierte Blut gleichmässig auf 4 Zentrifugiergläschen verteilt und 5' lang bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Nun saugt man vorsichtig in allen 4 Gläschen das Plasma, den Leucocytensaum und ca. den obersten ccm des Blutzellen enthaltenden Blutes ab. Mit einer Pipette geht man dann langsam bis auf den Grund des ersten Röhrchens ein und saugt behutsam etwa 2 ccm des Inhaltes an. Das Gleiche wiederholen wir bei den restlichen Gläschen, wobei wir die ersten zwei abpipetierten Portionen in ein Zentrifugenröhrchen - wir bezeichnen es mit 5 - und die Portionen 3 und 4 in ein Gläschen - 6 - geben. 5 und 6 bringen wir wieder für 60" in die Zentrifuge (3000 Touren) und saugen darauf neuerdings je die obersten Schichten ab. Auch jetzt geht man mit einer Pipette sorgfältig ein und entnimmt je ca. 1 ccm der Erythrocytensuspension am Grunde. Das so gewonnene Material übertragen wir in ein Röhrchen - 7 -. Dieses wird nochmals 60" zentrifugiert und nachher saugen wir diesmal bloss die oberste Schicht ab. Jetzt soll der Inhalt des Gläschens 7 aus reinen Erythrocyten bestehen, was mit der Leucocytenzählmethode nachgeprüft wird. Findet man keine Leucocyten mehr, so fertigen wir zur Sicherheit einen Ausstrich an, färben ihn in gewohnter Weise und untersuchen in Oelimmersion. Hier sollen ebenfalls keine weissen Blutkörperchen mehr zu sehen sein. Falls jedoch solche angetroffen werden, so hat man nicht genau gearbeitet und muss deshalb das angegebene Procedere weiterführen, bis die Zählungen negativ ausfallen. Indem man genügend Ausgangsmaterial bereitstellt, kann man beliebig viel reine Erythrocyten gewinnen. In 1 ccm unserer Erythrocytensuspension hat es annäherungsweise $8 \cdot 10^9$ Erythrocyten.

III. DIE KININWIRKUNG DER ERYTHROCYTEN

1a. Mit den nach II erhaltenen Erythrocyten stellen wir eine Hämoglobinlösung her. Zu diesem Zwecke versetzen wir 1 ccm des Erythrocytenblutes mit 5 ccm Aqua dest. Nach 5' zentrifugieren wir die Lösung 20' lang bei 3000 Touren, damit die Erythrocytenmembranen sedimentieren. Sie sind dann in Form einer kleinen weissen Kalotte am Grunde des Röhrchens zu erkennen. Den überstehenden Teil giessen wir ab und benutzen ihn als unsere Hämoglobinlösung. Ihr Hb-Gehalt beträgt jeweils 32 - 38 Sahli% (je nach Herstellung).

1b. Als weiteres Ausgangsmaterial benötigen wir ein plättchenfreies Citratplasma: Wir beschaffen uns 20 ccm Blut (Venenpunktion, Citratzusatz im Verhältnis 1 : 10). Sofortige Verarbeitung des Blutes nach Entnahme; sonst geben

nämlich die Blutzellen gerinnungsaktive Stoffe an das Plasma ab. Durch kurze Zentrifugierung trennen wir die korpusculären Elemente vom Plasma ab und geben dann das vorsichtig abpipetierte Plasma (ca. 10 ccm) für 60' bei 3000 Umdrehungen in die Zentrifuge. Auch hier sehen wir in Form einer weissen Kalotte die Thrombocyten am Grunde des Zentrifugenröhrchens. Das Plasma kann mühelos abgegossen werden, die Kalotte bleibt im Gläschen zurück. Die mikroskopische Prüfung des Plasmas auf Thrombocyten ergibt, dass tatsächlich keine solchen mehr vorhanden sind, oder dann höchstens nur Spuren davon.

2. DIE VERSUCHSANORDNUNG

Gebraucht werden die Gerinnungsgläschen von "Schott u. Gen. Jena". Wir kochen sie jedesmal vor Gebrauch mit konz. NaOH aus und waschen sie darauf gründlich mit Aqua dest. aus; denn nur auf diese Weise werden allfällige gerinnungsfähige Stoffe (von früheren Versuchen her), die sich unerwünscht bemerkbar machen könnten, zerstört. Ferner benötigen wir eine 5 % $CaCl_2$-Lösung und frisches Citrat-Testblut.

Unsere Versuchsreihe umfasst vorerst 3 Parallelversuche:

a) mit einer Hb-Lösung und
zellfreiem Plasma und $CaCl_2$

b) ein Kontrollversuch mit Ringerlösung
und zellfreiem Plasma und $CaCl_2$

c) ein Versuch mit Strumapressaft (der sehr reich an Thrombokinin ist)
und zellfreiem Plasma und $CaCl_2$

ad a): Wir übertragen in ein Schott-Gläschen:

1,0 ccm der Hb-Lösung, hergestellt nach 1a
1,0 ccm des plättchenfreien Citratplasmas, nach 1b
1 Tropfen $CaCl_2$-Lösung. Dieser Zusatz ist notwendig - dieses Gemisch wird nämlich noch verdünnt werden - damit auf alle Fälle genügend Ca-Jonen wirksam sind.

Im Moment des Ca-Zusatzes setzen wir eine Stoppuhr in Gang und betrachten diesen als unsern Zeitpunkt 0. Das Gläschen wird nach ca. 2' in nahezu horizontale Lage gebracht und, durch langsames Rotieren in dessen Längsachse, wird der Gerinnungsbeginn abgewartet, der eintritt, sobald die im Röhrchen sich befindende Mischung in den Gelzustand übergeht, was sich in einem plötzlichen, zuerst feinschichtigen Anhaften an der Glaswand zeigt. Wir lesen die Zeit ab und notieren sie. Von jetzt an wird das Gläschen während 30" kräftig geschüttelt, um das sich bildende Fibrin zu zerschlagen.

Dann geben wir

3 ccm Aqua dest. und
1 Tropfen Ca-Lösung hinzu.

Diese Zugabe bedeutet eine Verdünnung. Wir wollen damit den Thrombinabbau in seinem zeitlichen Verlaufe verzögern und können so das Maximum der Thrombinbildung besser ermitteln. Der Verdünnungsfaktor wird dann in der Ausrechnung der Thrombineinheiten natürlich berücksichtigt.

Gleich nach der Verdünnung wird das Gläschen 10" lang geschüttelt, zwecks guter Durchmischung. Von jetzt an entnehmen wir ungefähr alle Minuten 0,5 ccm unserer Hb-Lösung und geben sie zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt - wir haben ja die laufende Uhr neben uns - zu 0,5 ccm Testblut (schon abpipetiert in Schott-Gläschen), das wir seit einer halben Stunde im Wasserbad von 20° C aufbewahrt hielten. Durch eine schnell ausgeführte Rotationsbewegung streben wir eine gleichmässige Verteilung an und nachher halten wir das Gläschen sofort in horizontaler Lage und, unter langsamem Drehen, erkennen wir dann den Gerinnungseintritt. Ein Blick auf die Uhr gibt uns die Gerinnungszeit an, weil wir uns natürlich den "bestimmten" Zeitpunkt gemerkt haben. Auf diese Art erfolgt Messung um Messung. Die Gerinnungszeiten verhalten sich ganz allgemein nach Abb. 1.

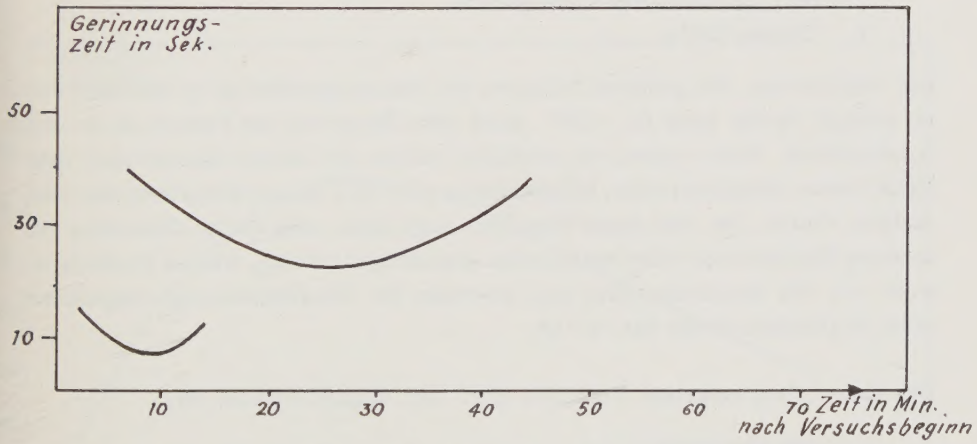

Abb. 1: Die Gerinnungszeiten einer sehr aktiven und einer wenig aktiven Hb-Lösung

Es ist dabei sehr wichtig, den Umschlagspunkt genau zu erfassen, deshalb richten wir uns in unseren Messungen danach, ob eine aktive Lösung vorliegt oder nicht, was wir meistens vorausahnen können, und zudem beschleunigen wir die Messintervalle, sobald wir bemerken, dass wir uns dem Umschlagspunkt nähern (die einzelnen Gerinnungszeiten differieren nur noch schwach oder überhaupt nicht mehr).

Es wird solange gemessen, bis wir uns wieder deutlich auf dem aufsteigenden Schenkel der Kurve befinden. Der zeitliche Ablauf des Versuches und die einzelnen Gerinnungszeiten werden genau im Versuchsprotokoll notiert.

ad b): Dies ist ein Kontrollversuch. Wir mischen

1,0 ccm plättchenfreies Citratplasma
1,0 ccm Ringerlösung
1 Tropfen der $CaCl_2$-Lösung

und warten den Gerinnungseintritt ab. Hier gehen die Vorgänge viel langsamer vor sich, doch es kommt auch hier nach ca. 20 - 30' eine Gerinnung zustande, dank der im Plasma vorhandenen gerinnungsaktiven Stoffe. Der weitere Verlauf des Versuches geht dann, nachdem die Gerinnung erfolgt ist, in gleicher Weise vor sich wie in a), wir verdünnen nach dem Schütteln wieder mit 3,0 ccm H_2O und

1 Tropfen $CaCl_2$.

schütteln nochmals 10" und beginnen darauf, zuerst in grösseren Zeitabständen, mit der Bestimmung der Gerinnungszeiten.

ad c): Hier verwenden wir

1,0 ccm eines Strumapressaftes (sehr reich an Thrombokinin)
1,0 ccm plättchenfreies Citratplasma
1 Tropfen $CaCl_2$

und beeilen uns, den genauen Zeitpunkt des Gerinnungseintrittes zu erfassen; denn er erfolgt bereits nach 60 - 120". Auch jetzt führen wir den Versuch in der oben beschriebenen Weise weiter; wir verdünnen ebenso und streben diesmal nach möglichst kurzen Messintervallen, beispielsweise alle 30", bis zur Erreichung des minimalsten Wertes. Der Sinn dieses Versuches liegt darin, dass das im Uebermass vorhandene Thrombokinin alles Prothrombin abzusättigen vermag, was im Versuche a), wenn wir die Gerinnungszeiten (und besonders die Thrombinbildung) vergleichen, nicht in gleichem Masse der Fall ist.

Der Ablauf eines einzelnen Versuches spielt sich folgendermassen ab:

1,0 ccm Hb-Lösung
1,0 ccm plättchenfreies Citratplasma
1 Tropfen $CaCl_2$
} gerinnen nach 7'50"

Schütteln 30" lang und dann Zugabe von

3,0 ccm H_2O
1 Tropfen $CaCl_2$

Portion	entnommen bei	Gerinnung bei	Gerinnungszeit
1	10'40"	10'50"	10"
2	11'45"	11'53"	8"
3	12'30"	12'37,5"	7,5"
4	13'30"	13'37,8"	7,8"
5	15'40"	15'50"	10"
6	16'50"	17'03"	13,0"

Jetzt bedürfen wir einer Standardisierung. Dazu drücken wir die Gerinnungszeit in Thrombineinheiten aus. Nach Lenggenhager definieren wir 1 Thrombineinheit als diejenige Menge Thrombin, welche in 1 ccm Normalcitratblut bei 20° C die erste Gerinnung in 60" auslöst. Von Gerinnungszeiten oberhalb 5" an herrschen lineare Beziehungen in der Thrombinbildung, sodass eine Annäherungsformel zur Bestimmung der Thrombineinheiten besteht (Lenggenhager):

$$\text{Thrombineinheiten} = \frac{56{,}8 \cdot \text{Verdünnung der Thrombinlösung}}{(\text{Gerinnungszeit} - 3{,}2)}$$

Wenn wir die oben angegebenen Werte umrechnen und sie graphisch auftragen, so erhalten wir die Kurve der Abb. 2:

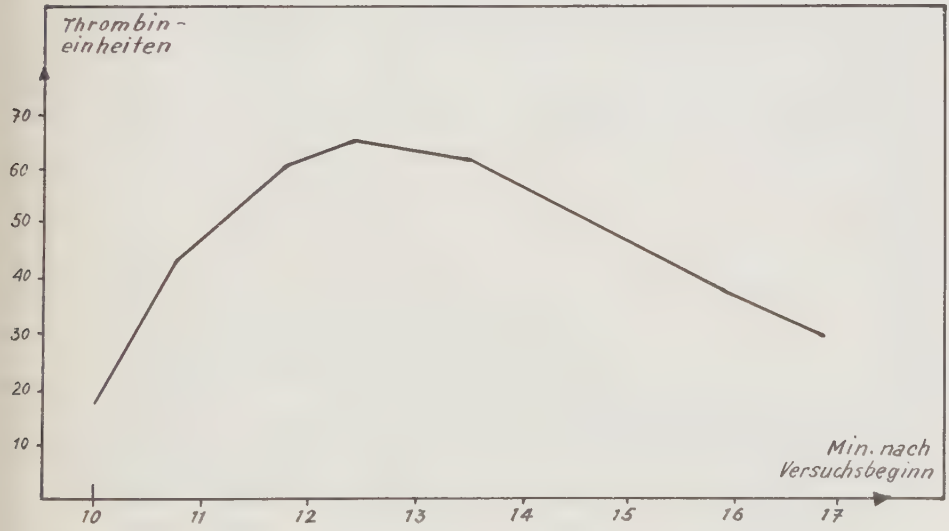

Abb. 2: Die Thrombinbildung beim Gerinnungsablauf am Beispiel einer Haemoglobinlösung.

Und jetzt betrachten wir 1 Serie von je 3 Parallelversuchen. Wir geben nur noch das Auftreten der Spontangerinnung und den Zeitpunkt und die Menge der maximalen Thrombinbildung an; denn dies ist ja für die vorliegende Arbeit wichtig.

Spontangerinnung trat auf:

bei a: nach 7'50"
bei b: 23'30"
bei c: 2'40"

Die maximalen Thrombinwerte waren erreicht:

bei a: 66 E. nach 12'30"
bei b: 3,6 E. nach 55'30"
bei c: 101,0 E. nach 3'25"

Die Abb. 3 zeigt uns die Thrombinwerte graphisch aufgezeichnet:

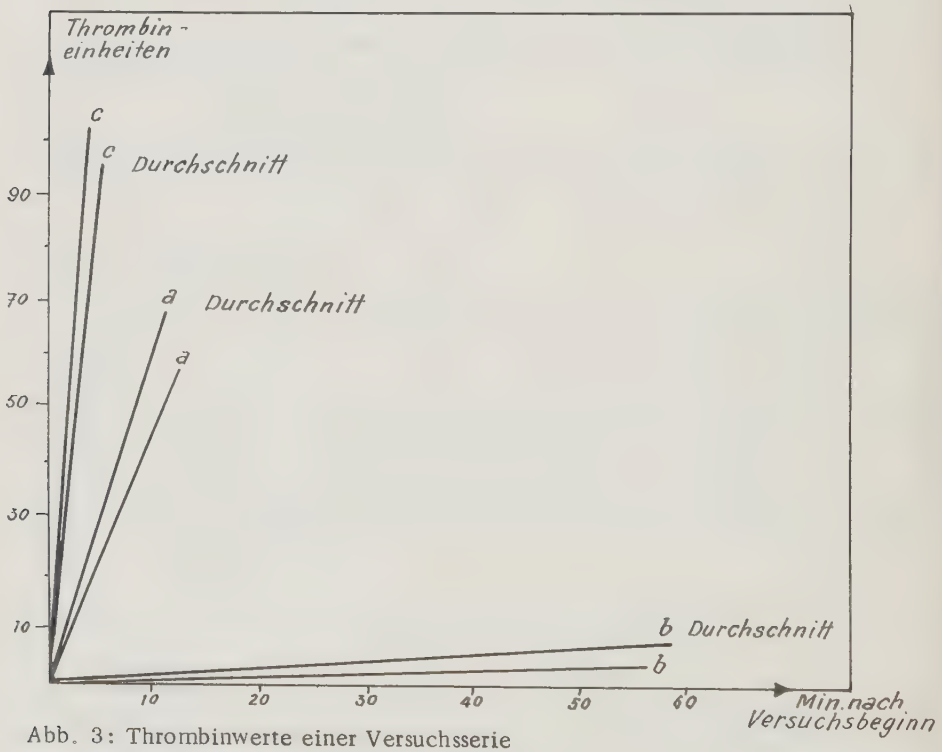

Abb. 3: Thrombinwerte einer Versuchsserie
a: Hb-Lösung
b: Kontrollversuch
c: Strumapressaft
Vergleichsweise sind die entsprechenden Durchschnittswerte aus 3 Versuchsserien angegeben.

Die Betrachtung der Abb. 3 und 4 lässt deutlich erkennen, dass die Hb-Lösung bedeutend aktiver ist in der Thrombinbildung als das plättchenfreie Citratplasma des Kontrollversuches. Diese Aktivität erreicht andererseits aber bloss ca. 50 % derjenigen einer Thrombokininlösung. Dasselbe kommt ebenfalls in den Zeitwerten bis zum Auftreten der Spontangerinnung zum Ausdruck.

Die Deutung dieser ersten Ergebnisse geht dahin, dass in der Hb-Lösung, also in den Erythrocyten, sicherlich eine erhebliche Menge Thrombokinin enthalten ist. (Beweis: Kürzere Gerinnungszeit als im Kontrollversuch). Ueberdies hat es in Erythrocyten auch Thrombokininoide, da ja die gebildete Thrombinmenge im Falle der Hb-Lösung weit grösser ist als im Kontrollversuch. (Unter dem Begriff Thrombokininoid verstehen wir nach Lenggenhager einen Stoff, der in einem prothrombinreichen Normalplasma vermehrte Thrombinbildung veranlasst, ohne indessen die Gerinnungszeit zu verkürzen).

2d) Auch die Erythrocytenmembranen binden - anscheinend adsorptiv - Thrombokinin und Kininoide an sich. Dies beweist uns folgender Versuch:

Wenn wir die frisch hergestellte Hb-Lösung (nach 2a) 15' lang bei 3000 Umdrehungen/Min. zentrifugieren, so setzen sich, wie schon beschrieben, die Erythrocytenhüllen in Form einer weisslichen Kalotte am Grunde des Zentrifugenröhrchens fest. Wir übertragen dieses Sediment, nach Abgiessen der überstehenden Hb-Lösung, in ein neues Gläschen und schwemmen es mit 6 ccm Ringerlösung auf. Wir zentrifugieren abermals bei gleicher Tourenzahl und erkennen die Membranen neuerdings am tiefsten Punkte des Röhrchens. Wir wiederholen die Aufschwemmung (= Waschung) nochmals und geben dann beim dritten Male nur 2 ccm Ringer hinzu. Nach der Zentrifugierung und dem Verwerfen der sich darüber befindenden Lösung setzen wir 2 ccm Aqua dest. bei und benützen, nach kräftigem Schütteln, diese Lösung zu unserem Versuche. In 1 ccm dieser Suspension hat es die Membranen von rund $4 \cdot 10^9$ Erythrocyten.

Versuch:

1,0 ccm der Erythrocytenhüllen-Suspension
1,0 ccm plättchenfreies Citratplasma nach 1b
1 Tropfen $CaCl_2$

gerinnen nach 14'50"

Nach 30" Schütteln Zugabe von

3,0 ccm H_2O
1 Tropfen $CaCl_2$

und wiederum 10" Schütteln.

Maximale Thrombinbildung nach 23'25": 16 Thrombineinheiten. In Abb. 4 vergleichen wir diesen Wert mit demjenigen des entsprechenden Kontrollversuches und ersehen daraus die deutlich höhere Aktivität der Hüllensuspension, immerhin ist sie noch geringer als diejenige einer Hb-Lösung.

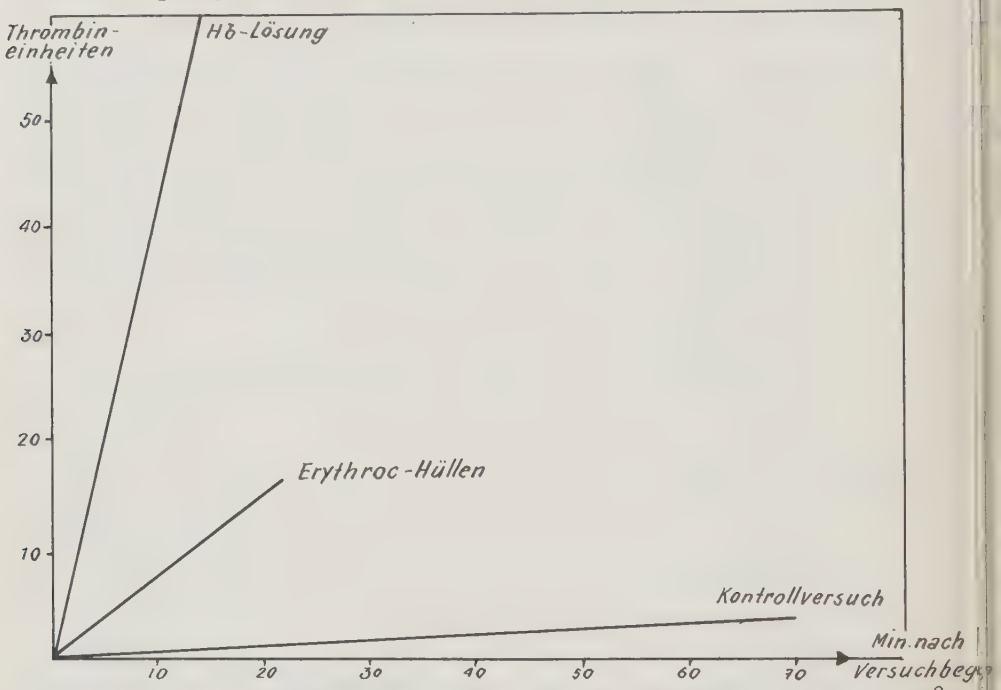

Abb. 4: Maximale Thrombinbildung bei einer Aufschwemmung von ca. $4 \cdot 10^9$ Erythrocytenhüllen, bei einer Hb-Lösung und beim Kontrollversuch

IV. DIE THROMBOKININ- UND KININOIDWIRKUNG DER PLAETTCHEN IM VERGLEICH MIT DERJENIGEN DER ERYTHROCYTEN

Wir stehen seit der Einleitung vor der Frage, ob nur die Plättchen gerinnungsaktive Stoffe abgeben. Dass auch die Erythrocyten solche haben, wurde im vorangehenden Abschnitt gezeigt, sodass wir nun versuchen müssen, eine quantitative Beziehung der Wirkung zu erzielen, durch Vergleich der Plättchen und Erythrocyten in quantitativen Versuchen.

Zuerst prüfen wir gewöhnliches Citratplasma, das also in 1 ccm ca. $2 \cdot 10^8$ Thrombocyten enthält, auf seine Gerinnungsaktivität. Wir gewinnen es, indem wir es, sofort nach Blutentnahme (Venenpunktion, Citratzusatz im Verhältnis 1:10) durch

5-minütige Zentrifugierung von den Erythrocyten und Leucocyten abtrennen. Die Plättchen vermögen nämlich während dieser kurzen Zentrifugationsdauer nicht zu sedimentieren.

Der Versuch:

1,0 ccm plättchenhaltiges Citratplasma
1,0 ccm plättchenfreies Citratplasma
1 Tropfen $CaCl_2$
} gerinnen nach 10'45"

nach 30" Schütteln Zusatz von

3,0 ccm Aqua dest. und
1 Tropfen $CaCl_2$

etc.

Maximale Thrombinbildung nach 22'00": = 14,5 E.

Für den zweiten Versuch reichern wir die Plättchen an: Wir stellen lege artis 12 ccm frisches plättchenhaltiges Citratplasma her und zentrifugieren dieses 1 Stunde lang. Dadurch setzen sich die Thrombocyten als Schicht am Grunde des Zentrifugenröhrchens fest. Abgiessen des überstehenden Plasmas. Das Sediment wird in 1 ccm Ringerlösung aufgeschwemmt. In dieser Suspension befinden sich rund 24 . 10^8 Plättchen. Damit machen wir unsern zweiten Versuch:

1,0 ccm der Plättchensuspension
1,0 ccm plättchenfreies Citratplasma
1 Tropfen $CaCl_2$
} gerinnen spontan in 5'15"

nach 30" Schütteln erfolgt der übliche Zusatz von

3,0 ccm H_2O
1 Tropfen $CaCl_2$

etc.

Maximale Thrombinbildung nach 8'40": = 36,5 E.

Im Vergleich dazu gerinnt der Kontrollversuch (nach 2b) spontan nach 24'35" und zeigt die maximale Thrombinbildung erst nach 69'10", was 3,9 Thrombineinheiten entspricht.

Die Hb-Lösung (nach 2a) mit ca. 13 . 10^8 Erythrocyten/ccm hergestellt, gerinnt spontan nach 8'25" und hat die maximale Thrombinbildung nach 13'00", bei einer Bildung von 59 Thrombineinheiten.

In Abb. 5 sind diese Ergebnisse aufgetragen:

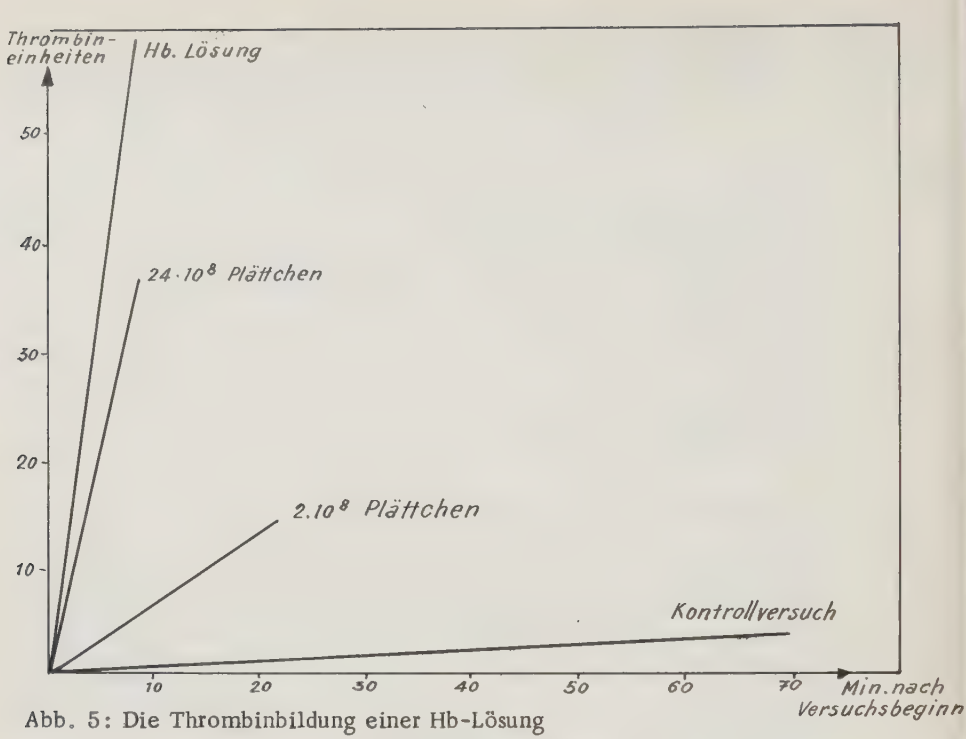

Abb. 5: Die Thrombinbildung einer Hb-Lösung
des Kontrollversuches
von plättchenhaltigem Plasma
einer Plättchensuspension

Diese Versuchsreihe zeigt uns, dass auch die Thrombocyten - hier rein adsorptiv, da wir ja die Plättchen intakt liessen - gerinnungsaktive Stoffe, also Prothrombokinin und Kininoide enthalten, ebenfalls in beträchtlichem Ausmasse, jedoch nicht soviel wie eine Hb-Lösung, die nach unseren Schätzungen ca. 13 . 10^8 Erythrocyten/ccm entspricht.

Auch folgender Versuch zeigt eine enge Verquickung von Thrombokinin- und Kininoidwirkung (überdies dürfte ein Oberflächenfaktor mit im Spiele sein):

Wir stellten eine Aufschwemmung von 1,28 . 10^8 Erythrocyten/ccm und eine solche von 3,68 . 10^8 Erythrocyten/ccm in Ringerlösung her. Wir erhielten sie ganz willkürlich, indem wir das eine Mal einen Tropfen des reinen Erythrocytenblutes mit etwas weniger, das andere Mal mit etwas mehr Ringerlösung versetzten. Mit der Erythrocytenzählmethode bekamen wir die Konzentration an Erythrocyten. Und nun gingen unsere Versuche wie oben vor sich:

1,0 ccm der Erythrocytensuspension (1)
1,0 ccm plättchenfreies Citratplasma
1 Tropfen $CaCl_2$
} gerinnen nach 16'55"

Die gleiche Mischung, bloss mit der Suspension (2) gerinnt nach 19'02"

Maximale Thrombinbildung im Falle 1: 10,5 E. nach 44'30"
im Falle 2: 15,0 E. nach 42'10"

Dabei können wir noch vermerken, dass in diesem Versuch die Erythrocytenkonzentrationen grössenordnungsmässig denjenigen der Thrombocyten in einem citrierten Normalplasma gleichkommen, und dass auch die Ergebnisse der Gerinnungszeiten und der Thrombinbildung sehr ähnlich ausfallen. Vergl. hiezu Abb. 6.

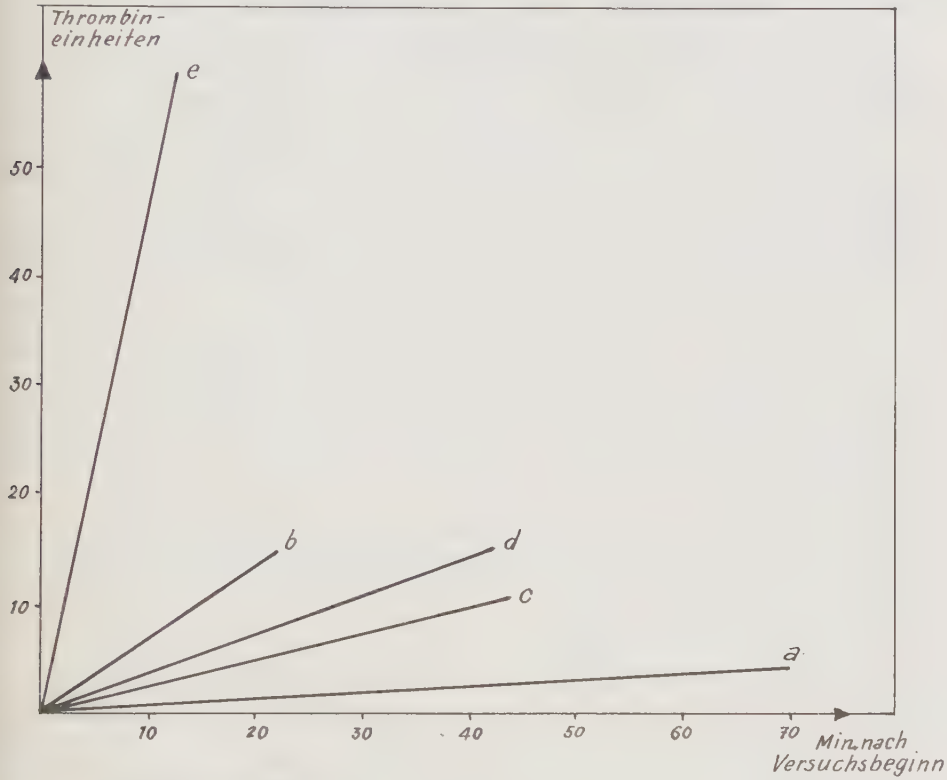

Abb. 6: Die Thrombinbildung

a) im Kontrollversuch
b) in normal-plättchenhaltigem Plasma (ca. 2 . 10^8/ccm)
c) in einer Erythrocytensuspension mit ca. 1,28 . 10^8/ccm
d) in einer Erythrocytensuspension mit ca. 3,68 . 10^8/ccm
e) in einer Hb-Lösung

V. DIE DISKUSSION

der Ergebnisse unserer Versuche ergibt folgendes:

1. Es zeigt sich, dass eine Hb-Lösung von ca. 30 Sahli% sehr gerinnungsaktiv ist. Die Wirkung ist eine kinin-kininoidartige. Da wir hämolysierten und die Erythrocytenmembranen abzentrifugierten, spielen die Kinine, die sonst (nach Lenggenhager) hauptsächlich adsorptiv an die - intakten - Blutzellen gebunden sind, nicht gewichtig mit, oder dann sind sie, während der Zentrifugierung, an die Hb-Lösung abgegeben worden.

2. Wenn wir die Erythrocyten nicht hämolysieren (Kapitel IV) und eine Gerinnung auslösen, so erhalten wir kürzere Gerinnungszeiten und höhere Thrombinbildung als im Kontrollversuch, bei welchem überhaupt keine Zellen beteiligt sind.

3. Auch an die Thrombocyten sind Kinine und Kininoide gebunden, mindestens in ebensolchem Masse wie an die Erythrocyten, eher etwas stärker, wenn wir das quantitative Verhalten von Erythrocyten zu Thrombocyten im Blute berücksichtigen.

4. Im Gerinnungsgeschehen spielt ein Oberflächenfaktor, herrührend von allen im Blute enthaltenen Zellen, mit.

5. Die Plättchen sind also an der Blutgerinnung keinesfalls allein beteiligt. Das Prothrombokinin, das durch das Thrombokatalysin zu Thrombokinin aktiviert wird, und die die Thrombinbildung vermehrenden Kininoide stammen aus allen Blutzellen. (Lenggenhager hat nachgewiesen, dass sie auch in den Leucocyten vorkommen. 3))

6. Unsere Ergebnisse weichen von der klassischen Gerinnungstheorie entscheidend ab. Den Blutplättchen kann man für die Gerinnungsauslösung keine spezifische Rolle zuschreiben.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem einleitenden Ueberblick über die Vorgänge der Blutgerinnung in der Auffassung Lenggenhagers und der Frage nach der Herkunft der gerinnungsaktiven Stoffe, wird eine einfache Zentrifugiermethode beschrieben zur Gewinnung reiner Erythrocyten.

Die Erythrocyten werden mit aqua dest. zu einer ca. 30-prozentigen Hämoglobinlösung hämolysiert, und es wird ihre Gerinnungsaktivität geprüft. Diese ist relativ hoch und erreicht rund 50 % der Wirkung eines thrombokininreichen Strumapresssaftes.

In Versuchen, bei denen, quantitativ ermittelt, unzerstörte Thrombocyten, und in anderen, bei welchen unhämolysierte Erythrocyten am Gerinnungsakt teilnehmen, wird gezeigt, dass die Kinin- und Kininoidwirkung annähernd in selbem Masse an beide Zellarten gebunden ist, und dass diese zudem eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung im Sinne der unspezifischen Oberflächenvergrösserung ausüben.

Die Deutung der Ergebnisse geht dahin, dass letztere mit der neuerdings gelegentlich wieder postulierten Alleinherrschaft der Thrombocyten beim Gerinnungsvorgang nicht in Einklang stehen, indem alle korpusculären Elemente des Blutes Gerinnungsvorstufen enthalten und beim Gerinnungsvorgang abgeben.

LITERATUR

1. Lenggenhager: Weitere Fortschritte in der Blutgerinnungslehre. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1949.

2. Ibidem : Vergl. S. 61 und Vers. 69 auf S. 62.

3. Ibidem : Vergl. S. 14, 15 und Abb. 11 auf S. 18.

4. Fonio : Ueber das funktionelle Verhalten der Thrombocyten beim Gerinnungsvorgang. (DIE MEDIZINISCHE, Friedr.-Karl Schattauer-Verlag. Stuttgart-Feuerbach. Jan. 1952, Nr. 1, S. 11)

5. Owren The Coagulation of Blood, Oslo 1947, Gundersen-Verlag.